

Toxicidad del glifosato formulado (Glyphos®) y Cosmo-Flux® para las ranas colombianas en estado larvario y juvenil 2. Toxicidad aguda de campo y de microcosmos de laboratorio.

M H Bernal¹ and K R Solomon² y G. Carrasquilla

¹ *Laboratory of Herpetology, Eco-Physiology & Ethology, Universidad del Tolima, Barrio Santa Elena, Ibagué, Tolima, Colombia,* ² *Centre for Toxicology and Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada y Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia..*

La aspersión de coca (*Erythroxylum coca*) con glifosato (mezcla de coca), una combinación de glifosato formulado, Glyphos®, y un adyuvante, Cosmo-Flux® en Colombia ha despertado preocupación por su posible impacto sobre los anfibios. Aunque las LC50 agudas para ocho especies de ranas colombianas variaron entre 1,2 a 2,78 mg a.e./L, estas exposiciones fueron llevadas a cabo en el laboratorio en ausencia de sedimentos y materia orgánica tal como ocurriría en condiciones reales de campo. Para evaluar el efecto de la aspersión sobre el hábitat de las ranas en condiciones de campo, se colocaron renacuajos en el estadio 25 de Gosner de *Rhinella granulosa*, *R. marina*, *Hypsiboas crepitans* y *Scinax ruber* en microcosmos exteriores hechos de tanques de polietileno plástico para piscicultura (2,07 m de diámetro, 37 cm de altura) en un área experimental en Tolima, Colombia. Los microcosmos fueron recubiertos en el fondo con una capa de 3 centímetros de tierra local y fueron llenados hasta 15 cm de profundidad (por encima del sedimento) con agua de fuentes también locales. Después se colocaron en los microcosmos hasta 100 renacuajos de cada especie de rana y se hizo aspersión con la mezcla para la coca a concentraciones superiores e inferiores a la dosis normal de aplicación (3,69 kg de glifosato a.e./ha). La mortalidad a las 96 h en el microcosmos control fue

entre 0 y 16% y los valores LC50 estuvieron 8,9 y 10,9 kg de glifosato a.e./ha (equivalente a las concentraciones iniciales de 5.963 a 7.303 µg de glifosato a.e./L). Sólo se observó mortalidad >LC50 en las especies probadas cuando la dosis de aplicación fue >2 veces la dosis normal de aplicación. En otros experimentos, ranas en estadios terrestres juvenil y adulto fueron expuestas a aspersión directa a un rango de concentraciones de mezcla de Glyphos®-Cosmo-Flux®. Los jóvenes y adultos fueron expuestos en recipientes plásticos para alimentos (19 x 19 cm). El fondo del recipiente se llenó con tierra húmeda y un lecho de hojas con espesores de 1 cm y 0,5 cm, respectivamente. La mortalidad en los controles fue baja, de 0 a 10% y fue de 0 a 35% con la dosis normal de aplicación. Los valores de LC50 variaron entre 4,5 kg a.e./ha y 22,8 kg a.e./ha, 1,5 a 6 veces mayores que la dosis normal de aplicación. Concluimos que bajo condiciones realistas de peor caso de exposición, la mezcla de Glyphos® y Cosmo-Flux® tal como se utiliza para el control de la coca en Colombia posee una baja toxicidad en los estadios acuáticos y terrestres de los anuros y que los riesgos para estos organismos en las condiciones de campo son muy bajos.

Recibido x de Julio de 2008; aceptado xx yy de 2008

© Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 2009. Este trabajo fue preparado como parte del Estudio titulado "La Producción de Drogas Ilícitas, el Medioambiente y la Salud Humana," financiado con contribuciones de los Gobiernos de Colombia y de los Estados Unidos de América. Las conclusiones y opiniones expresadas en el mismo pertenecen a los autores y no necesariamente representan las de la Organización de los Estados Americanos o su Secretaría General, la cual, a la fecha de adquisición de los derechos de autor, no ha formulado ninguna opinión respecto de aquellas.

Dirección de correspondencia: Dr. MH Bernal. Laboratorio de herpetología, Ecofisiología y Etología. Universidad del Tolima, Barrio Santa Elena, Ibagué, Tolima, Colombia mhbernal@ut.edu.co

Aunque la toxicidad de las formulaciones de glifosato para los anfibios en estado larvario ha sido relativamente bien caracterizada en el laboratorio (ver el artículo compañero, Bernal & Solomon 2008), pocos estudios han examinado realmente los efectos de las formulaciones herbicidas basadas en glifosato en el marco de condiciones realistas o en los estadios terrestres de los anfibios. Estudios de campo (Wojtaszek et al., 2004) llevados a cabo en larvas de *Rana clamitans* y *Rana pipiens* con la formulación de glifosato Vision® (equivalente a Roundup®) mostraron que la toxicidad aguda estaba fuertemente influenciada por factores naturales como la presencia de sedimento, macrofitos acuáticos y pH, que ocasionan generalmente

una menor toxicidad respecto a la de estudios de laboratorio. Los autores reportaron valores de LC50 a las 96 h que variaron entre 2.700 y 11.470 $\mu\text{g a.e./L}$ (Wojtaszek et al., 2004) en condiciones más relevantes al campo. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en las tasas medias de crecimiento o en la talla máxima en la metamorfosis para estas dos especies larvianas aún cuando se expusieron a concentraciones hasta de 14.300 $\mu\text{g a.e./L}$. Estas observaciones fueron consistentes con un estudio operativo (Thompson et al., 2004) en el cual el biomonitoreo con larvas de anfibios en jaulas no mostró respuestas de mortalidad significativas (48 h) de larvas de *R. pipiens* ($p = 0,194$) o de *R. clamitans* ($p = 0,129$). La mortalidad tampoco estuvo correlacionada significativamente ($p = 0,005$) con las concentraciones de exposición para las especies anfibias probadas. Los resultados sugirieron que las exposiciones que se presentan característicamente en los bosques pantanosos son insuficientes para inducir mortalidad aguda significativa en larvas de anfibios.

En contraste, Relyea (2004) reportó mortalidad y efectos en el crecimiento de Roundup Weed and Grass Killer® en varias especies de anfibios después de exposiciones a cuatro formulaciones comerciales de plaguicidas (diazinon, carbaril, malation y glifosato) solos o en combinación. La formulación de glifosato utilizada contenía el surfactante POEA y fue probada a concentraciones equivalentes de 740 o 1.480 $\mu\text{g a.e./L}$, con larvas en estadio Gosner 25 expuestas en tinas plásticas de 10 L puestas en el ambiente exterior durante un periodo de 16 días. No se observaron efectos significativos en el crecimiento en ninguna de las especies a $\geq 740 \mu\text{g a.e./L}$. Se observaron niveles significativos de mortalidad para *R. clamitans*, *R. catesbiana*, y *B. americanus* a 1,480 $\mu\text{g a.e./L}$ en tanto que *Hyla versicolor* y *R. pipiens* no mostraron mortalidad significativa a esta exposición. En un artículo posterior (Relyea 2005a), fueron expuestos renacuajos de varias especies de anfibios a la misma formulación de glifosato mencionada antes (Relyea 2004) en tanques de Ganado de 1000 L que sirvieron como microcosmos de campo. Como ya se ha señalado (Thompson et al., 2006), este estudio utilizó una única concentración de prueba de 3.800 $\mu\text{g a.e./L}$, equivalente a una dosis de aplicación de 16 kg a.e./ha sobre agua de 15 cm de profundidad, excesiva tanto para las concentraciones de exposición ambiental como para las dosis de aplicación habituales. En un estudio similar, Relyea (2005b) examinó los efectos de la misma formulación de glifosato (reportado en Relyea 2005c) a la misma concentración nominal en renacuajos de tres especies cuando se expusieron en tanques de ganado de 1.200 L sin tierra, con 19 L de arena o con 19 L de tierra arcillosa. El autor no reportó ningún efecto en la toxicidad de la formulación de glifosato por la

interacción del suelo ($p=0,108$). A esta alta concentración de prueba, durante un periodo de exposición de 20 días, la formulación de glifosato de nuevo resultó en una reducción significativa de la supervivencia ($< 4\%$) en las tres especies anfibias de prueba, independientemente de la tierra de tratamiento. En las primeras 24 h de exposición se presentó una mortalidad sustancial. Este resultado contrasta nítidamente con otras observaciones en la literatura (Tsui & Chu 2004, Wang et al., 2005) que muestran una reducción sustancial de la toxicidad aguda de Roundup® y el surfactante POEA en los organismos de prueba en presencia de sedimento. La discrepancia entre estas observaciones puede haber sido resultado de diferencias en las proporciones agua-sedimento y en la profundidad del agua sobre el sedimento, la cual fue mayor en el estudio de Relyea (2005c).

Pocos estudios han reportado toxicidad de las formulaciones de glifosato para los estadios terrestres de los anfibios. En un trabajo en Australia, los valores de LC50 a las 48 h para el Roundup® Herbicide probado contra *C. insignifera* adultos y metamorfos recientes variaron de 49.400-51.800 $\mu\text{g a.e./L}$ y fueron mayores que los reportados para las larvas (estadio Gosner 25 para esta especie) (Mann & Bidwell 1999). En un estudio de laboratorio (Relyea 2005b) en el cual se expusieron 3 especies diferentes (*R. sylvatica*, *B. woodhousii fowleri*, y *H. versicolor*) a aplicaciones directas (1,2 mg a.e./m²) en tinas plásticas de 10 L, 79% de la mortalidad se observó después de apenas 24 h. El autor afirmó que el glifosato formulado se aplicó a una dosis de 1.6 mg IA/m² (1.2 mg a.e./m²), que resultó de la aplicación de 6,5 ml de una formulación que contenía 1,9% de glifosato (supuestamente IPA) por tina (91 mg a.e./tina). Aunque el área de las tinas no fue reportada, para alcanzar la dosis de aplicación promulgada con el volumen de formulación empleado, se habría requerido un área algo mayor de 75 m²/tina. Recientemente se ha afirmado (Relyea, comunicación personal Sep. 3, 2008) que hubo un error tipográfico en la descripción en el artículo del experimento. Esta frase tiene el error. Donde dice "1.6 mg AI/m²" debería decir "1.6 mL AI/m²" y las dosis de aplicación fueron las recomendadas en la etiqueta del producto. No obstante un ingrediente activo (IA) normalmente se expresa en términos de masa, no de volumen, y el detalle de los métodos todavía es incompleto. Adicionalmente, las ranas fueron expuestas en toallas de papel, un escenario no muy representativo de las condiciones de campo.

Una revisión de los efectos ambientales de las aplicaciones aéreas del glifosato para controlar la coca ilícita (*Erythroxylum coca*) señala que la mezcla Glyphos®-Cosmo-Flux® tal como se utiliza en el programa de aspersión en Colombia, podría representar

un riesgo para la especie de ranas nativas expuestas en aguas superficiales característicamente asociadas al hábitat pantanoso de las ranas (15 cm de profundidad) (Solomon et al., 2007). No obstante, ésta no considera la absorción y / o degradación del glifosato (IA) y del surfactante POEA en la presencia de sedimentos para los cuales se ha reportado que reducen la exposición y por consiguiente el riesgo (Tsui & Chu 2004, Wang et al., 2005). El estudio aquí reportado fue llevado a cabo para comparar la toxicidad de la mezcla de Glyphos® y Cosmo-Flux® en anfibios en estado larvario según lo reportado bajo condiciones de laboratorio (Bernal & Solomon 2008) con la respuesta bajo condiciones de campo similares en las cuales los sedimentos y las partículas en suspensión están presentes en sistemas de aguas superficiales. Adicionalmente, la toxicidad de la mezcla de coca se evaluó en estadios terrestres de especies representativas bajo condiciones más realistas en presencia de tierra y un lecho de hojas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos de prueba

Cuatro de las especies previamente probadas en el laboratorio (Bernal & Solomon 2008) fueron utilizadas para los estudios de microcosmos de campo. Fueron recolectadas de Potrerillo, Tolima, Colombia (4°14'N; 74°58'W) a 430 m de altitud.

Procedimientos de prueba - microcosmos

Seis microcosmos exteriores a nivel de la tierra, hechos con tanques de ganado/tanques de piscicultura de plástico de polietileno de alta densidad apto para alimentos (2,07 m de diámetro, 37 cm altura) se colocaron en agujeros cavados en la tierra en el área experimental en el Tolima. Los microcosmos se colocaron en un área sombreada por árboles donde estaban protegidos de la luz solar directa. Los tanques

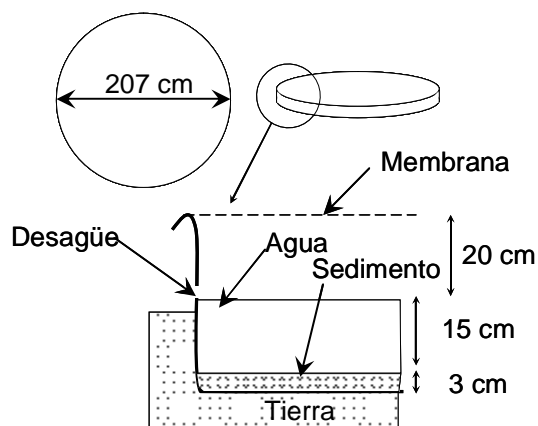


FIG. 1. Diagrama del diseño del microcosmos acuático.

se rodearon con tierra (Figura 1) pero los 22 cm superiores de la pared se dejaron descubiertos para evitar que corriera agua dentro de ellos. Los microcosmos fueron recubiertos en el fondo con una capa de 3 cm de tierra del lugar y luego se rellenaron hasta 15 cm (sobre el sedimento) con agua de una fuente local con dureza equivalente a 41 mg de CaCO_3 y alcalinidad equivalente a 51 mg de CaCO_3 . Una boca para el control de flujo protegida por una malla, a 15 cm por encima del sedimento, permitía el desagüe en caso de lluvia. Después de llenarlos con agua, los microcosmos fueron cubiertos con una tela de sombra plástica negra (malla de 3 mm) grapada en un marco de madera para excluir predadores como libélulas y aves. El microcosmos se dejó estabilizar durante cuatro a cinco días. Antes de agregar los renacuajos, se colocó una tela de malla fina de nylon (malla de 0,5 mm) en el microcosmos y se presionó en el sedimento. Esto se hizo para facilitar la recolección de las larvas después de la exposición.

En el primer experimento, se colocaron en cada microcosmos 100 larvas estadio Gosner 25 de *Rhinella granulosa* y de *R. marina*, con una tasa de carga de biomasa de aproximadamente

0,0122 g/L, inferior a la de 0,6 g/L recomendada en las guías de ASTM (ASTM 1998). Las dosis de aplicación de la mezcla Glyphos®-Cosmo-Flux® (la mezcla para la coca descrita detalladamente en el artículo complementario, Bernal & Solomon 2008) se seleccionaron según los experimentos preliminares.

Inmediatamente después de adicionar las larvas de rana, los microcosmos fueron asperjados con la mezcla para la coca en un rango de concentraciones equivalente a 0 (control) hasta 29,52 kg de glifosato a.e./ha. Las formulaciones de Glyphos® y Cosmo-Flux® fueron las utilizadas previamente (Bernal & Solomon 2008) y las cantidades fueron medidas con una pipeta de desplazamiento directo y mezcladas luego con 500 ml de agua. La cantidad total fue asperjada sobre los estanques, a una altura aproximada de 50 cm, con un aspersor de bomba manual de jardinería pequeño. La deriva de la aspersión se minimizó mediante: 1. configuración del aspersor para dispensar gotas grandes, 2. asperjar en ausencia de viento y, 3. asperjar en círculo desde el centro del estanque hasta el margen, pero nunca sobre el borde. Adicionalmente, había 20 cm de pared del estanque por encima del nivel del agua lo cual reduciría la pérdida de plaguicida por deriva de la aspersión. Con base en tablas de deriva de aspersión para aspersores manuales (pedestres) utilizando tamaños de gota pequeños para insecticidas y fungicidas (European Commission 2000), se estimó la pérdida por deriva inferior al 5%. Se tomaron muestras del agua del microcosmos a las 2, 24, 48 y 96 h después de la

TABLA 1.
Ranas juveniles y adultas* empleadas en las exposiciones de microcosmos terrestres.

Especie	Lugar de recolección	Masa media en mg (IC 95%)
<i>Rhinella typhonius</i> (Linnaeus, 1758)	Ibagué (4°25'N; 75°12' W)	0.047 (0.042 - 0.051)
<i>R. granulosa</i> (Spix, 1824)	Potreriillo (4°14'N; 74°58'W)	0.063 (0.060 - 0.066)
<i>R. marina</i> (Linnaeus, 1758)	Potreriillo (4°14'N; 74°58'W)	0.114 (0.110 - 0.117)
<i>Engystomops pustulosus</i> (Cope, 1864)	Ibagué (4°21'N; 75°06'W)	0.175 (0.165 - 0.185)
<i>Scinax ruber</i> (Laurenti, 1768)	Potreriillo (4°14'N; 74°58'W)	0.182 (0.172 - 0.191)
<i>Centrolene prosoblepon</i> (Boettger, 1892)	Falan (5°07'N; 74°58'W)	0.251 (0.241 - 0.261)
* <i>Pristimantis taeniatus</i> (Boulenger, 1912)	Ibagué (4°25'N; 75°12' W)	0.853 (0.821 - 0.884)
* <i>Dendrobates truncatus</i> (Cope, 1861)	Potreriillo (4°14'N; 74°58'W)	1.583 (1.514 - 1.651)

exposición y se midieron la concentración de oxígeno disuelto, el pH y la temperatura. Después de 96 h de exposición, se retiró cuidadosamente del microcosmos la malla de nylon de 0,5 mm, los renacuajos se transfirieron a un recipiente pequeño, se identificaron y se contabilizaron. Los renacuajos faltantes se tomaron como perdidos durante el proceso de recuperación o por descomposición después de morir. La mortalidad se basó en el número de animales muertos y faltantes comparado con el total de animales agregados al microcosmos al comienzo de la exposición.

Para el segundo experimento, se retiraron el agua y el sedimento del microcosmos los cuales se remplazaron por material fresco. El procedimiento anterior se repitió pero con larvas de *H. crepitans* (100 animales por cada tratamiento) y *S. ruber* (65 animales por cada tratamiento) con una tasa de carga de biomasa de aproximadamente 0,0153 g/L. Debido a las partículas presentes en el agua, no fue posible el análisis de ELISA y para la comparación con las observaciones del laboratorio las concentraciones nominales iniciales se calcularon a partir de las dosis de aplicación (Bernal & Solomon 2008).

Procedimientos de prueba – Estadios terrestres de ranas

Los estadios terrestres juveniles de las ranas se obtuvieron a partir de especímenes recolectados en el campo y criados en condiciones de laboratorio según se describió previamente (Bernal & Solomon 2008). También se obtuvieron del campo donde se llevaron a cabo estos experimentos algunos adultos pequeños de dos especies de ranas. Las especies utilizadas y las fuentes se enumeran en la Tabla 1. Se utilizaron como microcosmos de exposición terrestre recipientes plásticos de polietileno, de 19 x 19 cm (área de superficie interna = 361 cm²) y cerca de 2,3 L de capacidad, con una tapa hermética en la cual se hizo una apertura de ventilación de 7 x 7 cm la cual se protegió

con una malla. Se adicionaron tierra y un lecho de hojas obtenidos del jardín botánico de la Universidad del Tolima, un área no agrícola, en espesores de 1 cm y 0,5 cm respectivamente. La tierra y el lecho de hojas fueron humedecidos con agua destilada hasta cerca de 90% de la capacidad de retención, dando una humedad relativa de 80 a 95% en los recipientes. Las cámaras se ubicaron indiscriminadamente por grupo de tratamiento en un laboratorio en el cual se mantuvieron durante todo el periodo de prueba con aire acondicionado a una temperatura de 25 ± 2°C y con una relación día-noche de 12:12 horas.

Con base en las pruebas preliminares, las ranas fueron expuestas a series geométricas de concentraciones de Glyphos® - Cosmo-Flux® mayores y menores que la dosis de aplicación de campo (3,69 kg a.e. de glifosato/ha). Se preparó una solución madre primaria fresca mezclando, mediante inversión, 30 ml de Glyphos® y 0,690 ml de Cosmo-Flux® (obtenidos mediante una pipeta de desplazamiento directo) con 500 ml de agua, para dar una concentración que proporcionara una dosis de aplicación de 29,52 kg a.e. de glifosato/ha cuando se asperjaran 5 ml sobre el área del recipiente (361 cm²). La solución madre se diluyó en serie para proporcionar dosis de aplicación equivalentes a 14,76; 7,38; 3,69 y 1,85 kg a.e. de glifosato/ha y una control de agua.

Para cada grupo de dosis de tratamiento y control se utilizaron dos cámaras de prueba duplicadas. Se asignaron imparcialmente grupos de 10 ranas (*R. typhonius*, *R. granulosa*), 9 ranas (*R. marina* y *S. ruber*) y 5 ranas (*C. prosoblepon*, *E. pustulosus*, *P. taeniatus* y *D. truncatus*) a cada cámara de tratamiento para un total de 20, 18 y 10 ranas por concentración, respectivamente. Debido a la falta de disponibilidad, no se pudieron probar todas las especies en estadio larvario y en estadio terrestre. Para efectos de control de calidad, las ranas se pesaron en grupo antes de ser colocadas en las cámaras de prueba. Al finalizar el

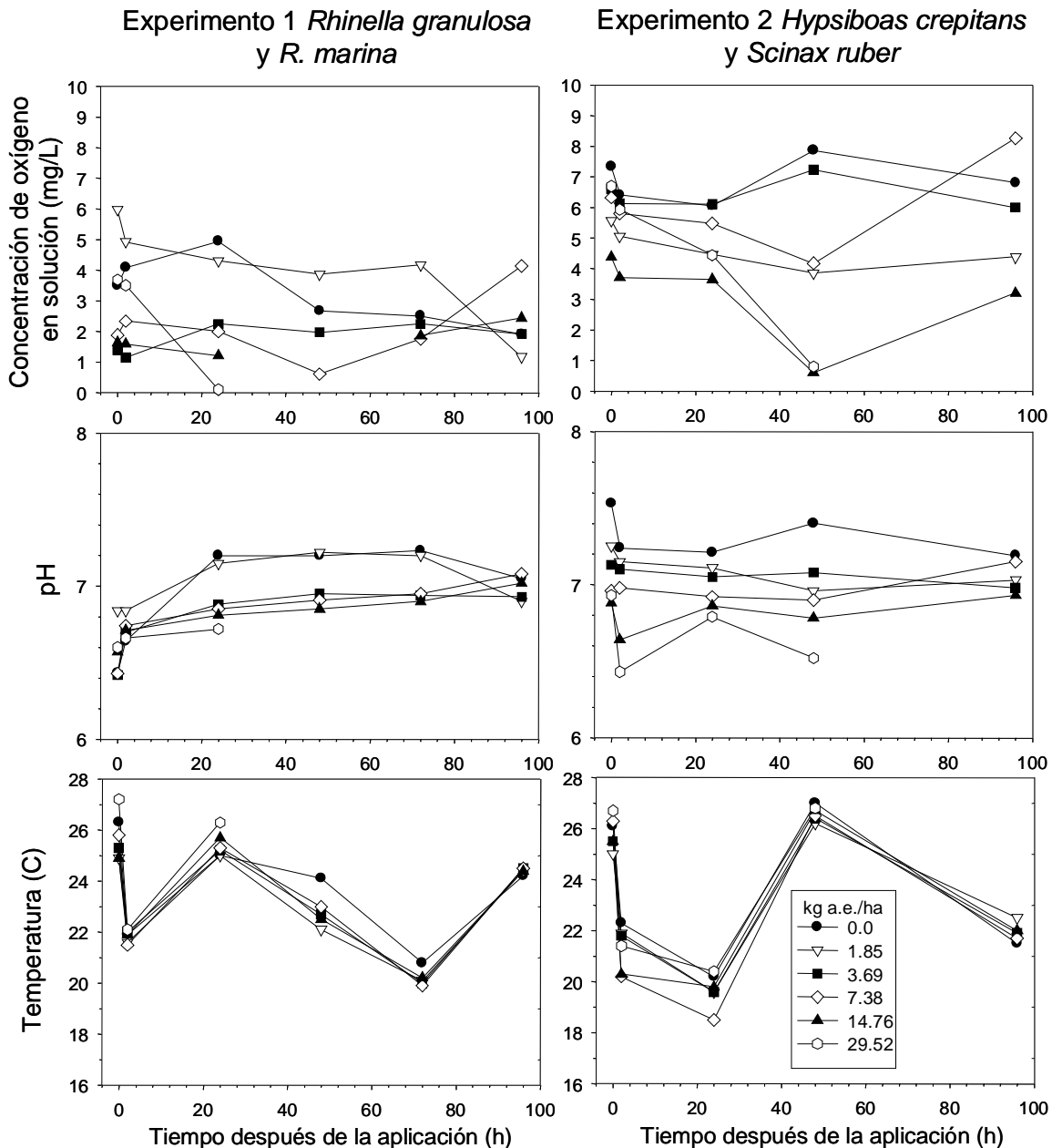


FIG. 2. Concentración de oxígeno en solución, pH y temperatura en el microcosmos acuático después del tratamiento con diferentes dosis de la mezcla para coca de Glyphos® y Como-Flux®. Las dosis de aplicación son las del glifosato (a.e.) en la mezcla.

estudio, fueron pesadas individualmente para calcular el promedio de masa corporal. La masa corporal fue casi semejante entre los tratamientos. No hay guías para las cargas de biomasa cuando se hacen pruebas con estadios terrestres de ranas pero en estos estudios la mortalidad en los controles fue <10%, lo cual sugiere que las cargas

no fueron excesivas. Las soluciones de prueba se preparaban frescas y se asperjaban sobre las ranas

utilizando un aspersor doméstico manual modificado acoplado a un reservorio de tubo para permitir la

aspersión completa de un volumen total de 5 ml. Este volumen de solución de aspersión se aplicó sobre las ranas comenzando con el control de agua y luego desde la concentración más baja hasta la más alta. Entre las pruebas, el aspersor se lavaba con agua limpia. Se hicieron observaciones de mortalidad y otros signos a las 4, 24, 48,72 y 96 horas después de iniciada la prueba. Todas las ranas fueron alimentadas *ad libitum* con pequeños insectos una vez al día, durante los experimentos.

Análisis estadístico

Del mismo modo que en los estudios de laboratorio (Bernal & Solomon 2008), los valores de LC1 y LC50

TABLA 2.

Mortalidad de especies de renacuajos expuestos a mezclas de Glyphos® y Cosmo-Flux® en el microcosmos de campo acuático

Especie	Porcentaje de mortalidad según las dosis de aplicación de glifosato (kg a.e./ha)						Valores de LC en kg a.e./ha ($\mu\text{g a.e./L}$) ¹	
	0	1.85	3.69	7.38	14.76	29.52	LC1	LC50
<i>R. marina</i>	10	13	25	41	82	100	2.4	8.9 (5,963)
<i>S. ruber</i>	4.6	4.6	15.4	12.3	100	100	-	10.3 (6,900)
<i>R. granulosa</i>	16	8	21	19	94	100	6.4	10.7 (7,169)
<i>H. crepitans</i>	0	0	3	3	86	100	4.8	10.9 (7,303)

¹ Concentración nominal inicial estimada a partir de la dosis de aplicación y la profundidad (15 cm) del agua con mezcla completa pero sin adsorción al sedimento o partículas.

TABLA 3.

Mortalidad de especies colombianas de ranas en estadios juvenil y adulto* expuestas a mezclas de Glyphos® y Cosmo-Flux® en microcosmos terrestres.

Especie	Porcentaje de mortalidad según las dosis de aplicación de glifosato (kg a.e./ha)						Valores de LC (kg a.e./ha)	
	0	1.85	3.69	7.38	14.76	29.52	LC1	LC50
<i>C. prosoblepon</i>	0	0	30	90	100	100	1.97	4.5
* <i>P. taeniatus</i>	0	0	20	70	--	--	1.93	5.6
<i>R. granulosa</i>	10	35	35	55	90	100	--	6.5
<i>S. ruber</i>	0	17	33	50	56	95	0.32	7.3
<i>R. typhonius</i>	10	10	15	35	50	80	1.56	14.8
<i>E. pustulosus</i>	0	0	0	0	30	80	7.02	19.6
<i>R. marina</i>	0	0	0	6	22	67	5.08	22.8
* <i>D. truncatus</i>	0	0	0	0	--	--	>7.38	>7.38

se calcularon utilizando la Versión 1.5 del programa Probit de USEPA (USEPA 1994). Cuando había insuficiente disponibilidad de datos para el programa Probit (ninguna o sólo una concentración con una respuesta entre 0 y 100%), la LC50 se estimó mediante interpolación de una gráfica de porcentaje de concentración vs. respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad del agua

La concentración de oxígeno en solución en el microcosmos (Figura 2) fue diferente en los dos experimentos. La concentración a las 0 h fue generalmente inferior en el experimento 1 que en el experimento 2. No obstante, en ambos experimentos, la concentración de oxígeno decayó durante el transcurso del periodo de exposición en el microcosmos tratado con las dosis mayores de glifosato, particularmente las de 14,7 y 29,5 kg de glifosato a.e./ha. La razón es incierta pero podría deberse al aumento en la demanda de oxígeno resultante de la muerte de larvas con estas dosis de tratamiento o debido a que las cantidades altas de glifosato estimulan la actividad microbiológica y ocasionan demanda de oxígeno. Lo anterior sólo se observó con dosis de aplicación mayores que las utilizadas en el campo (3.69 kg glifosato a.e./ha). El pH en el microcosmos generalmente fue más

consistente durante todas las exposiciones (Figura 2). Las temperaturas en el microcosmos fueron consistentes entre microcosmos (Figura 2). Como se esperaba, la temperatura no mostró respuesta a la concentración del tratamiento.

Respuestas en el microcosmos acuático

La mortalidad o pérdida de larvas de rana en el microcosmos de control en todos los experimentos estuvo entre 0 y 16%. En *R. granulosa*, hubo una mayor mortalidad (o pérdida), probablemente debida a su menor tamaño corporal, que podría acompañarse de menor eficiencia en la recuperación de las larvas. Los valores de LC50 en los microcosmos tratados fueron aproximadamente similares entre especies (Tabla 2). *R. marina* fue la especie más sensible pero no se observó gran mortalidad hasta que las dosis de aplicación no excedieron cuatro veces la dosis normal de 3,69 kg de glifosato a.e./ha, momento en el que se observó más de 80% de mortalidad. No se pudo calcular una LC50 para *S. ruber* pero se calculó a partir de una interpolación gráfica cercana a 10,3 kg glifosato a.e./ha (concentración inicial de 6.900 μg de glifosato a.e./ha), casi tres veces la dosis normal de aplicación. Las larvas de *R. granulosa* y *H. crepitans* fueron menos sensibles (Tabla 2) y no se observaron mortalidades altas hasta que la dosis de aplicación fue cercana a 14,8 de

glifosato a.e./ha (concentración inicial de 9.916 μg glifosato a.e./L).

En todos los casos, la sensibilidad de las larvas de rana en el microcosmos de campo fue menor que en las pruebas de toxicidad del laboratorio (Bernal & Solomon 2008). Esto es consistente con observaciones en la literatura en las que Roundup® (Tsui & Chu 2004) y el surfactante POEA (Wang et al., 2005) fueron menos tóxicos en presencia de sedimentos, probablemente como resultado de la rápida unión al sedimento y/o a la descomposición por los microbios, lo cual reduce la exposición (y la toxicidad aparente) en la columna de agua.

Respuestas en el microcosmos terrestre

Las observaciones de las ranas revelaron signos de toxicidad como la falta de movimiento normal o el movimiento lento. En algunas ranas, las extremidades posteriores estaban extendidas limitándolas para la marcha. En *S. ruber* y *P. taeniatus*, se observó una secreción lechosa proveniente de la piel. En general, la mayoría de respuestas tóxicas se expresaron en las 24 a 48 h de iniciada la prueba. Los datos de mortalidad para los estadios terrestres de las ocho especies de ranas (Tabla 3) se presentan en términos de dosis de aplicación nominal (kg a.e. glifosato/ha) para permitir la comparación con las dosis de aplicación en el campo. La mortalidad en los controles fue baja, de 0 a 10%.

El rango de valores de LC50 para adultos (5 veces) fue mayor que el observado (Bernal & Solomon 2008) en larvas (2,3 veces) y una distribución acumulativa de los valores de LC50 (FIG. 3) sugiere dos agrupaciones de especies en términos de sensibilidad. Entre los juveniles, el más sensible fue *C. prosoblepon* y el menos sensible *R. marina*. Entre los adultos, *P. taeniatus* fue sensible y *D. truncatus* fue muy tolerante a la mezcla de Glyphos® - Cosmo-Flux® (Tabla 3).

Hay varias razones posibles para estas diferencias en la sensibilidad. Es posible que la mayor sensibilidad de *C. prosoblepon* y *P. taeniatus* se deba a su piel más delgada, la cual es suave, translúcida y probablemente más permeable. En particular, esto puede explicar la mayor sensibilidad de *C. prosoblepon*, sus órganos internos son visibles a través del transparente vientre, una característica que les da a esta especie y a otras de la misma familia el nombre común de ranas de vidrio. Sin embargo, *D. truncatus* también tiene piel delgada y fue insensible. La alta sensibilidad de *R. granulosa* puede ser atribuible a su poca masa corporal (Tabla 1) y su mayor relación superficie-volumen. *S. ruber* tenía una mayor masa corporal (Tabla 1) y menor relación superficie masa corporal, pero su sensibilidad a glifosato-Cosmo-Flux® fue similar a *R. granulosa*. En

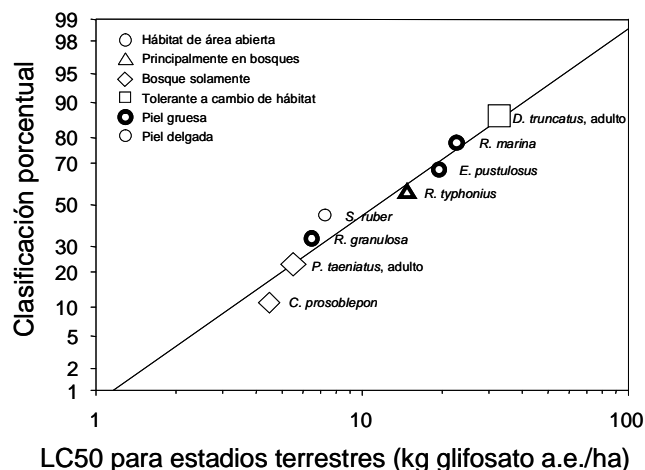


FIG. 3. Distribución de la frecuencia acumulativa de los valores de LC50 aguda para los estadios terrestres de ranas asperjadas con la mezcla de Glyphos® y Cosmo-Flux® empleada en la aspersión para erradicación. La masa relativa de las ranas (Tabla 1) está indicada con el tamaño de los símbolos. El valor para *D. truncatus*, que fue muy insensible (Tabla 3) está graficado para dar la información, pero no se utilizó en la regresión.

este caso, también es posible que la mayor sensibilidad se relacione con su piel delgada. La menor sensibilidad de *R. marina* puede ser atribuible a la mayor masa corporal de los juveniles (Tabla 2) y a su piel más gruesa y para *D. truncatus* a su mayor masa corporal. Tampoco hubo relación obvia entre la sensibilidad y el hábitat preferido, el cual se relaciona con la capacidad para tolerar la pérdida de agua (FIG.1) pero *D. truncatus* puede ser en general menos sensible a los plaguicidas toda vez que rutinariamente es recolectado en áreas agrícolas en las que se emplean plaguicidas.

En general, en cinco de las ocho especies experimentales, la mortalidad a la dosis de 3,69 kg a.e./ha utilizada en la aspersión para la erradicación estuvo entre 15% y 35% y los valores de LC50 entre 1,2 y 6 veces más que la dosis de aplicación para la aspersión de erradicación. La extrapolación de la distribución de la sensibilidad de la especie (FIG. 3) dio un intercepto del 5° centil de 2,2 kg de glifosato a.e./ha (para la mezcla de coca) lo cual sugiere que >95% de los valores de LC50 para las ranas terrestres no se incrementarían con dosis de aplicación inferiores a este valor.

CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios de microcosmos acuáticos y terrestres muestran que las respuestas de las ranas bajo condiciones realistas de exposición en el campo son menores de las que se podrían prever en estudios de toxicidad en el laboratorio y menores que las reportadas por algunos autores para otras especies. Es probable que la razón de esto sea que el glifosato y el

surfactante POEA se adsorban rápidamente en los sedimentos y materia orgánica presentes en los sistemas naturales o que se degraden rápidamente. Aunque no se han llevado a cabo estudios sobre la influencia de la profundidad de las aguas superficiales en el destino del glifosato y el POEA, es probable que este proceso sea más rápido en aguas poco profundas, en las que se espera que la difusión y mezcla sean más rápidas. Esto puede explicar las diferencias entre los resultados observados en este estudio y las observaciones de mortalidad en aguas más profundas reportadas en otros lugares (Relyea 2005a, c). Se esperaría que la mezcla en aguas más profundas sea menos rápida y que la adsorción en los sedimentos y la materia orgánica se retarde lo suficiente para que las exposiciones en el agua superficial puedan exceder los umbrales de toxicidad. La comparación directa de los dos estudios no es posible dado que las profundidades del agua son diferentes. La importancia de las interacciones entre la profundidad del agua, el tipo de sedimento, el contenido de materia orgánica y la actividad microbiológica se deben tratar en futuros estudios de destino ambiental con plaguicidas y surfactantes que se adsorban fuertemente en los sedimentos. Las interacciones entre los parámetros de calidad del agua tales como las concentraciones de los cationes divalentes, oxígeno e hidrogeniones (pH) pueden ser un campo de investigación general importante, tal como lo ha sugerido el trabajo en laboratorio sobre las interacciones del pH en las larvas de rana con Vision® (Edgington et al., 2004).

Las diferencias en la sensibilidad entre especies de estadios terrestres de rana posiblemente se debieron a una combinación de las diferencias en la masa corporal (relación área de superficie a volumen) y la permeabilidad de la piel. Sin embargo, estos factores y otros, como la preferencia de hábitat, no explican completamente la aparente distribución bimodal de la sensibilidad (FIG. 3). Una mayor comprensión de la toxicocinética de la captación de la formulación puede explicar las razones de la diferencia en susceptibilidades entre especies y sería un interesante tema de trabajo futuro que pueda explicar estas diferencias.

Para todas las especies probadas, las respuestas a la mezcla de Glyphos® - Cosmo-Flux® no fueron altas a la dosis de 3,67 kg a.e./ha empleada en la aspersión para erradicación en Colombia. Los experimentos de microcosmos terrestres mostraron que los juveniles de *S. ruber* y *R. granulosa* fueron relativamente menos tolerantes al glifosato-Cosmo-Flux® que sus renacuajos. Sin embargo, los resultados de *R. marina* (Tablas 2 y 3) mostraron lo contrario. En ranas australianas, Mann y Bidwell (1999), encontraron que los adultos y nuevos metamorfos de *C. insignifera*

fueron menos sensibles a Roundup® que los renacuajos, pero este estudio fue llevado a cabo en condiciones de laboratorio y por ende sus resultados no son directamente comparables con los nuestros. Encontramos que las mortalidades $\geq 50\%$ para los renacuajos, juveniles y adultos sólo se observaron a dosis de aplicación mayores que los 3,69 kg a.e./ha utilizados en la aspersión de erradicación en Colombia.

El riesgo en el terreno probablemente va a ser menor debido a la menor exposición. Los lugares >5 m por fuera del corredor de aspersión y sin cubierta vegetal recibirían dosis de depósito (Hewitt et al., 2008) menores que las de LC1 observadas en el microcosmos. Para las especies terrestres, asumiendo ausencia de cubierta vegetal, directamente debajo del corredor de aspersión no sería excedido ninguno de los valores observados de LC50. A 10 m del margen en la dirección del viento del corredor de aspersión se estaría protegido para todos los valores de LC1 medidos. Bajo las actuales condiciones de uso, la interceptación por los árboles y otra vegetación disminuiría adicionalmente la exposición y los riesgos subsiguientes, tal como se ha observado en la aspersión forestal (Thompson et al., 2004) y como ocurre también en las condiciones colombianas (Hewitt et al., 2008). Es improbable que las múltiples aplicaciones de aspersiones para erradicación estén en el rango de tiempo suficiente para la disipación completa del glifosato y los surfactantes del agua y/o el suelo. Las aspersiones son aplicadas con mucha exactitud y sólo se hace una pasada por encima del campo (Solomon et al., 2007), minimizando la probabilidad de una doble aplicación. Aunque hay riesgos bajos para las ranas en las áreas sin vegetación en los campos de coca que son asperjados directamente, el riesgo de exposiciones a plaguicidas más tóxicos utilizados por los productores de coca son mucho mayores (Brain & Solomon 2008). Al considerar la pequeña área de Colombia que de hecho es asperjada cada año (< 0.1% Solomon et al., 2007) y que las ranas no están asociadas exclusivamente con la producción de coca (Lynch & Arroyo 2008), concluimos que la mezcla de Glyphos® - Cosmo-Flux®, tal como se usa en Colombia para la erradicación de la coca presenta un ligero riesgo, no significativo ecológicamente, para las larvas y estadios terrestres de los anuros.

REFERENCIAS

- ASTM. 1998. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus*, (Vol. E 1439-91), West Conshohocken, PA, USA: ASTM International, pp. 825-836.
- Bernal, M. H., and Solomon, K. R. 2008. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos®) and Cosmo-Flux® to larval Colombian frogs 1. Laboratory acute toxicity, *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, In this volume.

- Brain, R. A., and Solomon, K. R. 2008. Comparative hazards of glyphosate, other pesticides, and other human activities to amphibians in the production of coca, *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, Accepted 2008 08 25.
- Edginton, A. N., Sheridan, P. M., Stephenson, G. R., Thompson, D. G., and Boermans, H. J. 2004. Comparative effects of pH and Vision herbicide on two life stages of four anuran amphibian species, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:815-822.
- European Commission. 2000. Guidance document on aquatic ecotoxicology, Technical Report 8075/VI/97 rev 7, Directorate General for Agriculture.
- Hewitt, A. J., Solomon, K. R., and Marshall, E. J. P. 2008. Spray droplet size, drift potential, and risks to non-target organisms from aerially-applied glyphosate for coca control in Columbia, *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, Accepted 2008 08 07.
- Lynch, J. D., and Arroyo, S. 2008. Risks to Colombian amphibian fauna from cultivation of coca (*Erythroxylum coca*): A geographical analysis, *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, Submitted.
- Mann, R. M., and Bidwell, J. R. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of Southwestern Australian frogs, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36:193-199.
- Relyea, R. A. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:1737-1742.
- Relyea, R. A. 2005a. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities, *Ecol. Appl.*, 15:618-627.
- Relyea, R. A. 2005b. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians, *Ecol. Appl.*, 15:1118-1124.
- Relyea, R. A. 2005c. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48:351-357.
- Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J., and Sanin, L.-H. 2007. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 190:43-125.
- Thompson, D. G., Solomon, K. R., Wojtaszek, B. F., Edginton, A. N., and Stephenson, G. R. 2006. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities, *Ecol. Appl.*, 16:2022-2027.
- Thompson, D. G., Wojtaszek, B. F., Staznik, B., Chartrand, D. T., and Stephenson, G. R. 2004. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:843-849.
- Tsui, M. T. K., and Chu, L. M. 2004. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment porewater exposures, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46:316-323.
- USEPA. 1994. Probit Program, Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm>
- Wang, N., Besser, J. M., Buckler, D. R., Honegger, J. L., Ingersoll, C. G., Johnson, B. T., Kurtzweil, M. L., MacGregor, J., and McKee, M. J. 2005. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms, *Chemosphere*, 59:545-551.
- Wojtaszek, B. F., Staznik, B., Chartrand, D. T., Stephenson, G. R., and Thompson, D. G. 2004. Effects of Vision herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:832-842.

